

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin  
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. A. Gräßmann

**17 $\beta$ -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE  
AUS HUMANENDOMETRIUM DER  
PROLIFERATIONS- UND SEKRETIONSPHASE UND AUS  
ENDOMETRIUMKARZINOM**

vorgelegt von

**Rolf Jeske**  
aus Berlin

**Inaugural-Dissertation .**

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den medizinischen Fachbereichen der  
Freien Universität Berlin

**1977**  
—



Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin  
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. A. Gräßmann

17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Humanendometrium der  
Proliferations- und Sekretionsphase und  
aus Endometriumkarzinom

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an  
den medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Rolf Jeske  
aus Berlin

Referent: Privatdozent Dr. Kunhard Pollow

Korreferent: Professor Dr. F. Neumann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der  
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3.5.1977



Ich danke Herrn Priv. Dozent Dr. med. Kunhard Pollow für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie ihm und seiner Frau Barbara Pollow für die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte, o.Prof., danke ich für großzügige Unterstützung und wertvolle Hinweise.



## Inhalt

|          |                                                     |          |
|----------|-----------------------------------------------------|----------|
| 1.       | Einleitung                                          | Seite 6  |
| 2.       | Material und Methodik                               | Seite 10 |
| 2.1.     | Trivialnamen und Abkürzungen                        | Seite 10 |
| 2.2.     | Material                                            | Seite 10 |
| 2.2.1.   | Steroide                                            | Seite 10 |
| 2.2.2.   | Substanzen                                          | Seite 10 |
| 2.2.3.   | Puffermedien                                        | Seite 11 |
| 2.3.     | Gewebeaufarbeitung                                  | Seite 11 |
| 2.3.1.   | Kerne                                               | Seite 11 |
| 2.3.2.   | Mitochondrien                                       | Seite 11 |
| 2.3.2.1. | Subfraktionierung der Mitochondrien                 | Seite 12 |
| 2.3.3.   | Mikrosomen                                          | Seite 12 |
| 2.3.3.1. | Subfraktionierung der Mikrosomen                    | Seite 12 |
| 2.3.4.   | Cytoplasma-Langzeitzentrifugation                   | Seite 13 |
| 2.4.     | Bestimmung der Enzymaktivitäten                     | Seite 13 |
| 2.4.1.   | 17 $\beta$ -HSD-Aktivität                           | Seite 13 |
| 2.4.1.1. | Inkubationsbedingungen                              | Seite 13 |
| 2.4.1.2. | Dünnschichtchromatographie                          | Seite 13 |
| 2.4.1.3. | Identifizierung der Metabolite                      | Seite 14 |
| 2.4.1.4. | Quantitative Bestimmung der<br>Östradiol-Metabolite | Seite 14 |
| 2.4.2.   | Leitenzyme                                          | Seite 15 |
| 2.5.     | DNS- und RNS-Bestimmung                             | Seite 15 |
| 2.6.     | Proteinbestimmung                                   | Seite 15 |
| 2.7.     | Elektronenmikroskopie                               | Seite 15 |
| 3.       | Ergebnisse                                          | Seite 16 |
| 3.1.     | Subzelluläre Verteilung                             | Seite 16 |

|          |                                                                                                                                                               |          |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 3.1.1.   | Reinheitsbestimmung der<br>subzellulären Fraktionen                                                                                                           | Seite 17 |
| 3.1.1.1. | Leitenzymbestimmungen                                                                                                                                         | Seite 17 |
| 3.1.1.2. | Elektronenmikroskopie                                                                                                                                         | Seite 17 |
| 3.1.2.   | Die Verteilung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität<br>innerhalb der Mitochondrienfraktion                                                                           | Seite 21 |
| 3.1.3.   | Die Verteilung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität<br>innerhalb der Mikrosomenfraktion                                                                              | Seite 22 |
| 3.1.4.   | Nachweis der cytoplasmatischen Her-<br>kunft der löslichen 17 $\beta$ -HSD                                                                                    | Seite 23 |
| 3.2.     | Abhängigkeit der spezifischen<br>17 $\beta$ -HSD-Aktivität normalen Human-<br>Endometriums von der Zyklusphase                                                | Seite 24 |
| 3.3.     | Abhängigkeit der spezifischen<br>17 $\beta$ -HSD-Aktivität verschieden hoch<br>differenzierter Endometriumkarzinome<br>von Differenzierungsgrad des Karzinoms | Seite 25 |
| 3.4.     | Charakterisierung der cytoplasmati-<br>schen 17 $\beta$ -HSD                                                                                                  | Seite 26 |
| 3.4.1.   | Enzymmenge                                                                                                                                                    | Seite 26 |
| 3.4.2.   | Zeit                                                                                                                                                          | Seite 27 |
| 3.4.3.   | Temperatur                                                                                                                                                    | Seite 28 |
| 3.4.4.   | pH-Optimum                                                                                                                                                    | Seite 28 |
| 3.4.5.   | Substratspezifität                                                                                                                                            | Seite 29 |
| 3.4.6.   | Coenzym-spezifität                                                                                                                                            | Seite 31 |
| 3.4.7.   | $K_m$ -Wert und maximale Umsatz-<br>geschwindigkeit                                                                                                           | Seite 31 |
| 3.4.8.   | Wirkung verschiedener Substanzen<br>auf die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD                                                                                  | Seite 32 |

|          |                                                                                                                                                                |          |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 3.4.9.   | Inaktivierung durch Kältebehandlung                                                                                                                            | Seite 33 |
| 3.4.9.1. | Schutzwirkung verschiedener Substanzen<br>(NAD, NADP, Östradiol und Glycerin) gegen<br>die Kälteinaktivierung (4°C) der cytoplasma-<br>tischen 17 $\beta$ -HSD | Seite 34 |
| 4.       | Diskussion                                                                                                                                                     | Seite 35 |
| 5.       | Zusammenfassung                                                                                                                                                | Seite 41 |
| 6.       | Literatur                                                                                                                                                      | Seite 43 |
|          | Lebenslauf                                                                                                                                                     | Seite 47 |

## 1. Einleitung

Die Kenntnisse über das Prinzip der innersekretorischen Regulation und über die Wirkung der weiblichen Sexualhormone an den Target-Organen beruhen im wesentlichen auf drei klassischen Versuchen: 1. der Entfernung der als Hormonbildner vermuteten Drüse verbunden mit dem Studium der Ausfallerscheinungen, 2. der Implantation des gleichen Organs oder bestimmter Organteile in die Milz und 3. Parabiose zur Behebung der Ausfallerscheinungen.

Nach Aufklärung der chemischen Konstitution der Sexualhormone und ihrer Synthese war es möglich, die spezifischen Wirkungen der verschiedenen Hormongruppen besser zu erkennen. Neben den Allgemeinwirkungen wie Wasserretention, Verschiebung von Stoffwechselgleichgewichten, Einflußnahme auf das Blutbild und das Zentralnervensystem (zentral ausgelöste Temperaturschwankungen, Veränderungen der Persönlichkeitsstruktur, psychische Effekte (1-5)) lösen Sexualsteroido an den sekundären Sexualorganen zellspezifische Phänomene aus.

Am ausgeprägtesten und morphologisch am besten erfaßbar sind die durch Östrogene und Gestagene hervorgerufenen Veränderungen an der Uterusmucosa (Endometrium).

Die Östrogene wirken auf die Regeneration und das Wachstum des während der Menstruation abgestoßenen Endometriums stimulierend: Anstieg des Mitoseindex des Stroma- und Drüsenepithelzellen (6), Aktivierung der RNS-Synthese (7-11), de-novo-Synthese der alkalischen Phosphatase mit einem Aktivitätsgipfel periovulär (12,13). Durch die östrogenstimulierten Wachstumsvorgänge entsteht unter Ausbildung eines Stromaödems eine neue Zona functionalis, deren Dicke am Ende der Proliferationsphase etwa 5-7 mm beträgt (13-15). Aus den nach der Menstruation anfangs runden kurzen Drüsenschläuchen sind lange gerade entstanden, deren einreihiges Zylinderepithel reich an Nukleinsäuren ist. Als Zeichen einer erhöhten Syntheseleistung finden sich vorwiegend rauhe Strukturen im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Kerne sind länglich und liegen zentral (13-15).

Die mit der Ovulation einsetzende Gestagenproduktion bewirkt eine Reihe von Veränderungen am Endometrium, die es zur Versorgung der im Falle einer Schwangerschaft implantierten befruchteten Eizelle befähigen: Mitosen und Zellwachstum werden eingestellt, die Drüsenschläuche schlängeln sich (13-15). Die in der Proliferationsphase hohe Zahl der Mikrosomen in den Drüsenepithelien nimmt ab. Basal bilden sich Sekretgranula, die Glycogen, Mucopolysaccharide, Lipide und Proteine enthalten (13-15); die Kerne werden dadurch nach apikal abgedrängt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase, die zum Zeitpunkt der Ovulation den höchsten Wert erreicht hatte, nimmt ab zugunsten einer allmählichen Aktivitätszunahme der sauren Phosphatase (13-15). Etwa in der Mitte der postovulatorischen Phase setzt die Sekretion ein: Der Inhalt der epithelialen Granula entleert sich in das Drüsenlumen; die Kerne der Drüsenepithelien rücken wieder nach zentral. Außerdem zeigt die Sekretionsphase eine starke Vaskularisierung mit Ausbildung zahlreicher Spiralarterien im Hinblick auf eine zu erwartende Schwangerschaft (13-15).

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die Sexualsteroidoide am Endometrium eine so verschiedenartige und ausgeprägte Wirkung entfalten können.

Untersuchungen von Jensen et al. (16) vor etwa fünfzehn Jahren an Ratten ergaben, daß nach Injektion von Östradiol-17 $\beta$ , in dessen Steroidskelett <sup>3</sup>H stoffwechselstabil eingebaut war, eine spezifische Anreicherung des Steroidhormons in den einzelnen Target- Organen erfolgte. Jensen schloß aus diesem Befund auf die Existenz spezifischer Östrogenbindender Rezeptoren.

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten in der Folgezeit Östrogenbindende Rezeptorproteine im Cytoplasma und in den Zellkernen verschiedener Target- Organe der Östrogene nachweisen und bestimmte kinetische Eigenschaften beschreiben (17-31). Aus diesen Befunden entwickelte sich eine Hypothese für den Wirkungsmechanismus der Östrogene: Nach Aufnahme in die Target- zelle wird das Östrogen an spezifische cytoplasmatische Rezeptorproteine gebunden, der entstandene Östrogen-Rezeptorkomplex durchquert das Cytoplasma und transloziert nach Modifikation in einem energieverbrauchenden Prozeß in den Kern. Im Kern assoziiert der Steroid-Rezeptorkomplex mit dem Chromatin und induziert die Bildung spezifischer m-RNS, die die Synthese spezifischer Proteine in Gang setzt (32-35). Unklar sind die

Fragen geblieben, wie die Intensität der verschiedenen Östrogenwirkungen gegeneinander abgestuft wird und wie der Steroid-Rezeptorkomplex nach Entfaltung seiner molekularbiologischen Wirkung wieder inaktiviert wird. Letztere Frage ist von besonderem Interesse angesichts der Tatsache, daß die östrogene Wirksamkeit in der Sekretionsphase trotz hoher Östrogenspiegel aufhört. Es muß hier ein östrogeninaktivierendes Prinzip angenommen werden, welches die biologische Östrogenaktivität "zykluskonform" steuert.

Neben vielen Möglichkeiten (z. B. Reduzierung des Östradioleinstroms in die Targetzelle während der Sekretionsphase durch Zellwandpermeabilitätsänderung, Modifikation der Rezeptoraffinität gegenüber Östradiol oder Blockade des Östrogen-Rezeptor-Komplex-Transportes in den Zellkern) bietet sich die enzymatische Oxydation des biologisch hochaktiven Östradiols zu Östron an, das eine geringere biologische Aktivität als Östradiol aufweist.

Diese Vorstellung geht auf Ergebnisse von Ryan und Engel (36) zurück, die beweisen konnten, daß Östradiol-17 $\beta$  durch Inkubation mit Gewebeschnitten aus Humanendometrium zu Östron oxydiert wird. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Sweat et al. (37,38) sowie Collins et al. (39) bei unterschiedlichen Bedingungen:

Tseng und Gurpide (40) gelang in jüngster Zeit der Nachweis, daß die spezifische Aktivität dieses Östradiol-17 $\beta$ -oxydierenden Systems (17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 17 $\beta$ -HSD) in Gewebehomogenaten von Humanendometrium beträchtlichen Zyklusschwankungen unterliegt. Dieser Befund untermauert die Hypothese, daß die 17 $\beta$ -HSD in entscheidender Weise an der zykluskonformen Regulierung der biologischen Östradiolaktivität beteiligt ist.

Anhand statistischer Auswertung klinischen Untersuchungsmaterials ließ sich eine auffallende Häufung von Endometriumkarzinomen bei Patientinnen feststellen, die an in den Östrogenhaushalt eingreifenden Störungen erkrankt waren, so beispielsweise bei polycystischen Ovarien, hormonsezierenden Ovarialtumoren, Lebererkrankungen und Fettsucht (41-46). In diesem Zusammenhang erscheint auch eine kausale Beziehung zwischen einem pathologischen Östrogenmetabolismus einerseits und der Karzinomentstehung durchaus denkbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zykluskonformen Schwankungen der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in normalem Human-Endometrium zu erfassen, wobei die Enzymaktivität in den einzelnen subzellulären Fraktionen getrennt ermittelt wird. Außerdem finden Endometriumkarzinome unterschiedlichen Differenzierungsgrades Verwendung. Die Reinheitskontrolle der Zellkompartimente erfolgt durch Aktivitätsbestimmung der Leitenzyme sowie durch elektronenoptische Aufnahmen der präparierten Zellfraktionen.

Unter Verwendung von Enzympräparationen aus sekretorisch umgewandeltem Human-Endometrium werden weiterhin die wesentlichen kinetischen Eigenschaften der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD ermittelt.

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Trivialnamen und Abkürzungen

Folgende Trivialnamen und Abkürzungen werden verwendet:

Östradiol: 3-Hydroxyöstra-1,3,5(10)trien-17 $\beta$ -diol

Östron: 3-Hydroxyöstra-1,3,5(10)trien-17 $\beta$ -on

Testosteron: 17 $\beta$ -Hydroxy-4-androsten-3-on

Androstendion: 4-Androsten-3,17-dion

17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

### 2.2. Material

#### 2.2.1. Steroide

(4-<sup>14</sup>C)Östradiol (spezif. Aktivität 58 mCi/mM), (4-<sup>14</sup>C)Östron (spezif. Aktivität 50 mCi/mM), (4-<sup>14</sup>C)Testosteron (spezif. Aktivität 58 mCi/mM) und (4-<sup>14</sup>C)Androstendion (spezif. Aktivität 56 mCi/mM) waren Handelspräparate und wurden von "The Radiochemical Centre", Amersham, England, bezogen. Die Reinheit aller radioaktiv markierten Steroide wurde dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel- Fertigplatten (Fa. Merck, Darmstadt), Schichtdicke 0,25 mm, in unterschiedlichen Laufmitteln geprüft. Nicht radioaktiv markierte Steroide wurden von der Fa. Schering AG, Berlin, zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.2. Substanzen

NAD, NADP, NADH, NADPH, ADP, Hexokinase, Succinat, Cytochrom c aus Rinderherz, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Test, DNS aus Kalbsthymus, RNS aus Hefe: Biochemica Boehringer, Mannheim; Saccharose, Glycerin (doppelt destilliert), CsCl, EDTA, Triäthanolamin, p.a. Lösungsmittel: E. Merck, Darmstadt; Ficoll: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; Rinderserumalbumin: Behringwerke Marburg/Lahn; Triton X-100: Serva, Heidelberg; p-Chlormercuribenzoat: C. Roth, Karlsruhe.

### 2.2.3. Puffermedien

- A: 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol, 0,25 M Saccharose
- B: 2,4 M Saccharose, 1 mM Magnesiumacetat
- C: 0,25 M Saccharose, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 25 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 24 mM Thioglycerin

### 2.3. Gewebeaufarbeitung

Normale Endometrien bzw. Endometriumkarzinome wurden durch Kürettage oder durch Ausschaben des hysterektomierten Uterus gewonnen (Prof. Dr. E. Boquoi, Städtische Frauenklinik Berlin-Charlottenburg, Direktor Prof. Dr. H. Lax). Histologische Kontrolle des gewonnenen Gewebes zeigte reine Endometrium- bzw. Karzinompräparationen. Die Datierung der Zyklusphase erfolgte histologisch (13).

Die Präparate wurden auf Eis zum Laboratorium transportiert und sofort bei 4°C folgendennmaßen aufgearbeitet: Nach zweimaligem Waschen in 0,9%iger Kochsalzlösung wurde das Gewebe im Glashomogenisator mit Teflonstempel (Braun, Melsungen, Germany) bei 1000 U/min durch fünfmaligen Vor- und Rücklauf in 4 ml Medium A pro g Gewebe nach Zusatz von 20% Glycerin (v/v) homogenisiert. Durch Filtration über 4 Gazelagen erfolgte die Abtrennung der nicht homogenisierbaren Gewebeanteile.

#### 2.3.1. Kerne

Die Kerne wurden durch Zentrifugation des Filtrates für 15 min bei 850 x g (Rotor SS 34, Servall RC-2) abgetrennt, in Medium A aufgenommen und über Medium B bei 60 000 x g (Rotor SW 25, Ultrazentrifuge L2-65B, Fa. Beckman) für 60 min sedimentiert. Der Niederschlag wurde in Medium A zweimal gewaschen, in einem Minimum an Medium C resuspendiert unter Zusatz von 0,25% Triton X-100 (v/v) und für 60 min bei 60 000 x g in Medium C ohne Triton X-100, dem 2,2 M Saccharose zugesetzt war, sedimentiert (47).

#### 2.3.2. Mitochondrien

Aus dem kernfreien Homogenat (850 x g-Überstand) wurde zunächst eine Fraktion schwerer Mitochondrien bei 5 500 x g für 15 min abgetrennt, der Nie-

derschlag einmal in Medium A gewaschen und in Anlehnung an Brown (48) durch eine Ficoll-Gradienten- Zentrifugation in mitochondrien-, peroxy-somen- und lysosomenreiche Fraktionen separiert (Ficoll- Gradiente 0-15% (w/v) in Medium A, Saccharose- Polster 2,4 m, 7000 U/min für 15 min, Rotor SW 25, Fa. Beckman). Die endgültige Reinigung der Rohfraktion erfolgte über eine Saccharose- Dichtegradiente (20-60% (w/v)) bei 30 000 U/min, 4 Std. im Rotor SW 65.

Entsprechend wurde nach Abtrennung der schweren Mitochondrien ein bei 12 000 x g für 15 min gewonnenes Sediment mit einem hohen Anteil an leichten Mitochondrien, Lysosomen und Peroxysomen aufgearbeitet.

#### 2.3.2.1. Subfraktionierung der Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden nach der von Schnaitman et al. (49) entwickelten Methode der Digitonin-Behandlung in Fraktionen zu je 100 mg Protein/ml in 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, 20 mM Tri-äthanolamin, pH 7,4, und 500 mg Rinderserumalbumin/ml suspendiert und mit 1,5 mg Digitonin/10 mg mitochondrialen Proteins unter vorsichtigem Rühren versetzt. Nach 15 min wurde die Suspension mit der oben angegebenen Suspensionslösung 1 : 3 verdünnt, homogenisiert und bei 12 000 x g für 15 min zentrifugiert. Die weiteren Operationen entsprachen der Vorschrift von Chan et al. (50). Die membranösen Fraktionen wurden nach Whereat et al. (51) weiter gereinigt.

#### 2.3.3. Mikrosomen

Aus dem mitochondrienfreien Überstand (12 000 x g-Überstand) wurde durch Sedimentation bei 105 000 x g für 60 min im Rotor 30 (Fa. Beckman) die Mikrosomenfraktion gewonnen und zweimal in Medium A gewaschen. Der Überstand enthielt alle nicht sedimentierenden cytoplasmatischen Anteile.

#### 2.3.3.1. Subfraktionierung der Mikrosomen

Die Mikrosomen wurden in rauhe und glatte Strukturen nach der Methode von Dallner, Siekevitz und Palade (52) getrennt: 25 ml einer 1,3 M Saccharose-lösung, welche 15 mM an Cäsiumchlorid war, wurde in 5,0 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Über diese Lösung wurde die zu untersuchende Lösung unter Zusatz von 15 mM Cäsiumchlorid überschichtet. Die Zentrifugation er-

folgte in einem SW 65-Rotor für 210 min bei 130 000 x g.

#### 2.3.4. Cytoplasma-Langzeitzentrifugation

Die Cytoplasmafraktion (105 000 x g-Überstand) wurde im Anschluß mit 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4, im Verhältnis 1 : 4 verdünnt und für 30 Stunden bei 158 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4, aufgenommen.

#### 2.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten

##### 2.4.1. 17 $\beta$ -HSD-Aktivität

Die Bestimmung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität erfolgte durch Messung der Transformation von Östradiol zu Östron durch das Enzymprotein unter standardisierten Bedingungen.

##### 2.4.1.1. Inkubationsbedingungen

Pro Inkubation wurden eingesetzt: 0,1  $\mu$ Cl  $^{14}$ C markiertes Steroid, 10 mM nicht radioaktiv markiertes Steroid, 500 mM Coenzym, Protein, Ringer-PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,4, ad 4,1 ml. Die Steroide waren nach dem Abdampfen des Lösungsmittels in 0,1 ml Propylenglykol aufgenommen worden (Endkonz. 2,4%). Die Inkubationen erfolgten in einem Warburg-Schüttelthermostaten unter Luftzutritt bei 37°C. Sie wurden gestartet durch Zugabe des Coenzyms und durch Einbringen der Reaktionsgefäße in Eiswasser gestoppt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Sofort nach der Inkubation wurden die Steroide dreimal mit jeweils 5 ml Äther/Chloroform 3:1 extrahiert, die Extrakte vereinigt und zur Trockene eingeengt.

##### 2.4.1.2. Dünnschichtchromatographie

Die Steroidmetaboliten wurden dünnschichtchromatographisch auf Fertigplatten (Kieselgel F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,25 mm, Fa. M. Woelm, Eschwege, Deutschland bzw. Merck, Darmstadt) aufsteigend im geschlossenen System in den Laufmitteln Cyclohexan/Essigester 1:1, Benzol/Methanol 19:1 und Chloroform/Aceton 17:3 getrennt. Die Steroide wurden mit äthanolischer Schwefelsäure bzw. durch auffallendes UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.4.1.3. Identifizierung der Metabolite

Die Identifizierung der einzelnen Metabolite und Metabolitderivate erfolgte 1. durch dünn-schichtchromatographische Analyse und Rf- Wert- Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen, 2. durch Acetylierung nach der Vorschrift von Zaffaroni und Burton (53) bzw. Connel und Eik-Nes (54) oder Oxydation nach Lieberman et al. (55) und 3. durch Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln nach Zusatz nicht radioaktiv markierter Steroide bis zur Konstanz der spezifischen Aktivität (cpm/mg) (siehe Tab. 1).

| Metabolite                               | Rekristallisation nach<br>"carrier"-Zugabe | Lösungsmittel    | Spezif. Aktivität<br>(dpm/mg) |             |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------|
|                                          |                                            |                  | Kristall                      | Mutterlauge |
| (4- <sup>14</sup> C)-Östron              | 1.                                         | Methanol         | 21897                         | 21008       |
|                                          | 2.                                         | Benzol/Hexan     | 21064                         | 21237       |
|                                          | 3.                                         | Aceton           | 21642                         | 21345       |
| (4- <sup>14</sup> C)-Östradiol           | 1.                                         | Methanol         | 13684                         | 13735       |
|                                          | 2.                                         | Benzol/Hexan     | 13236                         | 13231       |
|                                          | 3.                                         | Aceton           | 12894                         | 13008       |
| (4- <sup>14</sup> C)- Androsten-<br>dion | 1.                                         | Methanol         | 17378                         | 17135       |
|                                          | 2.                                         | Benzol/Hexan     | 17137                         | 17538       |
|                                          | 3.                                         | Essigester/Hexan | 17437                         | 17235       |
| (4- <sup>14</sup> C)- Testosteron        | 1.                                         | Methanol         | 8374                          | 8538        |
|                                          | 2.                                         | Benzol/Hexan     | 8738                          | 8638        |
|                                          | 3.                                         | Essigester/Hexan | 8417                          | 8235        |

Tab. 1 Identifizierung von (4-<sup>14</sup>C)- Steroidhormon- Metaboliten nach dem Verfahren der umgekehrten Isotopenverdünnung

### 2.4.1.4. Quantitative Bestimmung der Östradiol- Metabolite

Die quantitative Bestimmung der radioaktiv markierten Steroide erfolgte durch Messung der Radioaktivität mit einem Dünnschichtscanner der Fa. Berthold, Wildbad, Modell LB 2723, unter Verwendung eines fensterlosen Methandurchflußzählers mit 2π-Zählgeometrie. Die Zählausbeute wurde für jedes dünn-schichtchromatographische System gesondert ermittelt und aufgrund einer Eichkurve, die mit einem endogenen Standard angelegt wurde, korrigiert. Sie betrug für <sup>14</sup>C etwa 18%. In Zusatzversuchen mit (4-<sup>14</sup>C)- Östradiol-17β wurde für die gesamte Aufarbeitung eine mittlere Wiederfindung von 90% ermittelt.

#### 2.4.2. Leitenzyme

Die Bestimmung der Leitenzyme erfolgte nach bewährten Routinemethoden: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase nach Bücher et al. (56). Succinat-Dehydrogenase nach Arrigoni und Singer (57). NADPH-Cytochrom-c-Reduktase nach Omura und Takesue (58). Urat-Oxidase nach Mahler et al. (59) bei 25°C. Saure Phosphatase nach Leighton et al. (60). Monoamin-Oxydase und Adenylat-Kinase nach Schnaitman et al. (61). Glutamat-Dehydrogenase nach Bergmeyer (62).

#### 2.5. DNS- und RNS- Bestimmung

DNS wurde nach Burton (63) bestimmt. Die Eichung erfolgte mit DNS aus Kalbsthymus. RNS wurde nach Ceriotti bestimmt (64).

#### 2.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (65) mit Rinderserumalbumin als Standard. In Gegenwart von Detergenz wurde eine Trübung beobachtet. In diesen Fällen wurde die Biuret-Methode nach Beisenherz (66) verwendet.

#### 2.7. Elektronenmikroskopie

Das Material wurde mit Glutaraldehyd nach der Methode von Karnovsky (67) fixiert. Die Kontrastierung erfolgte in gepufferter Osmium-tetroxidlösung (Natriumkakyolat-Puffer, pH 7,3). Anschließend wurde das Material in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) entwässert und in E. R. L. (aliphatisches Epoxid) nach der Methode von Spurr (68) eingebettet. Mit einem LKB-Mikrotom wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit Uranylcitrat in Bleicitratlösung nachkontrastiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Elmikroskop 1A, Fa. Siemens, ausgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Subzelluläre Verteilung

Wie die Tab. 2 zeigt, in der die Verteilung der Leitenzyme und der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in den einzelnen subzellulären Kompartimenten sekretorisch umgewandelten Human-Endometriums dargestellt ist, ist der Hauptanteil der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in den komplexen Strukturen der Mitochondrien und der Mikrosomenfraktion lokalisiert; die in der Cytoplasma- und der gereinigten Kernfraktion nachgewiesenen spezifischen Enzymaktivitäten der 17 $\beta$ -HSD sind 20- bis 50mal niedriger.

|               | Glucose-6-P-OH             | Succinat-OH | Saure Phosphatase | Urat-Oxidase | NADPH-Cytochrom-C-<br>Reduktase | 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-<br>Oxidoreduktase |
|---------------|----------------------------|-------------|-------------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|
|               | (nMol/hg Protein x 30 min) |             |                   |              |                                 |                                               |
| Homogenat     | 4,1                        | 2,8         | 23,0              | 1,7          | 8,9                             | 2,7                                           |
| Kerne         | n. n.                      | n. n.       | n. n.             | n. n.        | 1,8                             | 1,7                                           |
| Mitochondrien | n. n.                      | 9,8         | 28,4              | 3,2          | 7,1                             | 11,3                                          |
| Lysosomen     | n. n.                      | 1,2         | 78,8              | 1,8          | 5,7                             | 2,4                                           |
| Peroxisomen   | n. n.                      | 2,0         | 24,3              | 11,5         | 6,8                             | 1,8                                           |
| Mikrosomen    | n. n.                      | n. n.       | 7,8               | n. n.        | 32,4                            | 9,8                                           |
| Cytoplasma    | 11,3                       | n. n.       | n. n.             | n. n.        | 3,2                             | 0,2                                           |

Tab. 2 Spezifische Aktivitäten der Leitenzyme und der 17 $\beta$ -HSD in den präparierten Zellfraktionen sekretorisch umgewandelten Human-Endometriums. Die Bestimmung der Markerenzymaktivitäten geschah nach den in Abschnitt 2 angegebenen Verfahren, die spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität wurde unter Standardbedingungen bestimmt: 0,1  $\mu$ Ci ( $^{40}$ ,0018  $\mu$ M) ( $^{14}$ C)-Östradiol und 10  $\mu$ M nicht radioaktiv markiertes Östradiol wurden in 0,1 ml Propylen-glykol ( $\Delta$ Endkonzentration von 2,4%) aufgenommen. Unter Zusatz von 400  $\mu$ M NAD wurde dieser Ansatz mit Enzymprotein in Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4 (Gesamtvolumen 4,1 ml) für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einbringen der Reaktionsgefäße in Eiswasser gestoppt, die Steroide dreimal mit Äther/Chloroform 3:1 extrahiert, die Extrakte vereinigt und zur Trockene eingengt. Die Trennung der Östradiol-Metabolite geschah dünnschichtchromatographisch aufsteigend im geschlossenen System auf Kieselgel-HF-Platten in den Laufmitteln Benzol/Methanol 19:1, Cyclohexan/Essigester 1:1 oder Chloroform/Aceton 17:3.

### 3.1.1. Reinheitsbestimmung der subzellulären Fraktionen

#### 3.1.1.1. Leitenzymbestimmungen

Die zur Separierung der subzellulären Fraktionen verwendeten Methoden erlaubten, wie die in Tab. 2 dargestellte Markerenzymbestimmung zeigt, keine absolute Reindarstellung der einzelnen Fraktionen. So war eine geringgradige Verunreinigung der Kernfraktion, die durch einen DNS/RNS-Quotienten von 0,27 charakterisiert war, durch mikrosomale Anteile nicht zu verhindern. Die funktionell intakte Mitochondrienfraktion zeigte lysosomale, peroxysomale und mikrosomale Verunreinigungen, stellte also eine Mischfraktion dar, wobei aber die spezifischen Aktivitäten der extramitochondrialen Fremdenzyme als befriedigend niedrig betrachtet werden konnten. Verunreinigungen der Mikrosomen durch lysosomale saure Phosphatase und mitochondriale Verunreinigungen der Lysosomenfraktion waren zu vernachlässigen, dagegen zeigte die Peroxysomenfraktion lysosomale und mikrosomale Fremdaktivitäten. Die in Tab. 2 erfaßten Zellorganellen imponieren nicht durch den hohen Reinheitsgrad wie der von Leighton et al. (60) erhaltene, gestatten aber eine eindeutige Zuordnung der Enzyme zu den einzelnen Zellfraktionen.

#### 3.1.1.2. Elektronenmikroskopie

Auch elektronenoptische Aufnahmen der aufgearbeiteten Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion zeigen eine deutliche Trennung der einzelnen Kompartimente: Abb. 1a zeigt, daß die gereinigte Kernfraktion durch amorphes Material zerstörter Kernstrukturen und durch Membranelemente geringgradig verunreinigt war. Die Mitochondrien (Abb. 1b) stellten sich in einem gequollenen Zustand mit einer alterierten Cristae-Struktur dar. Die Mikrosomenfraktion (Abb. 1c) bestand im wesentlichen aus membranösen Strukturen des ER und aus freien Ribosomen bzw. Polysomen.

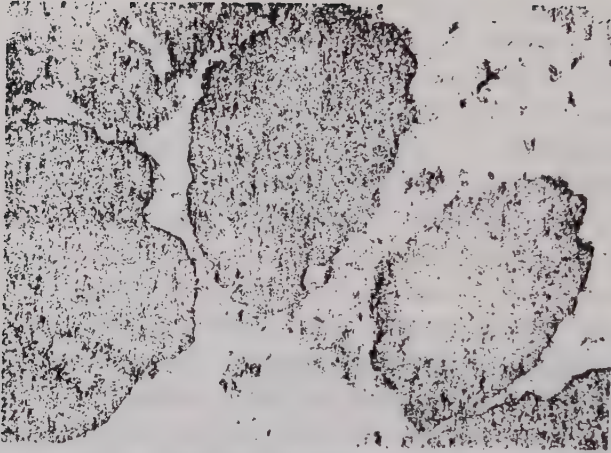


Abb. 1a Kernfraktion, Vergrößerung 13 800fach

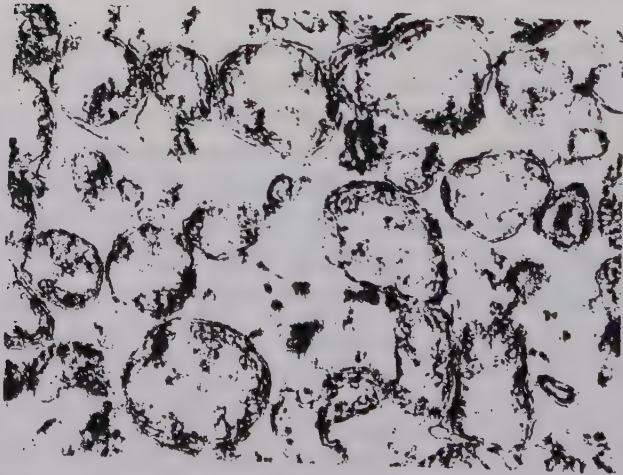


Abb. 1b Mitochondrien, Vergrößerung 45 000fach. Es handelt sich um den 12 000 x g-Niederschlag nach Ficoll-Gradienten-Zentrifugation.

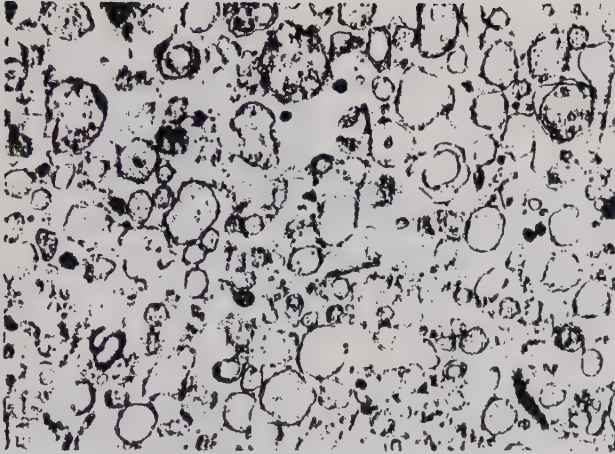


Abb. 1c Mikrosomen, Vergrößerung 30 000fach

Abbn. 1a - 1c Elektronenoptische Aufnahmen der gereinigten subzellulären Fraktionen. Die Ausführungstechnik der Aufnahmen ist ausführlich in Abschnitt 2 beschrieben.

Die in Abb. 2 dargestellten Radiodünnschichtchromatogramme zeigen in typischer Weise die Transformation von Östradiol-17 $\beta$  zu Östron durch die cytoplasmatische, mikrosomale und mitochondriale 17 $\beta$ -HSD. Neben Östron als Hauptmetaboliten finden sich höherpolare Metaboliten (<2% der gebildeten Östron-Menge), die aber nicht näher identifiziert wurden.

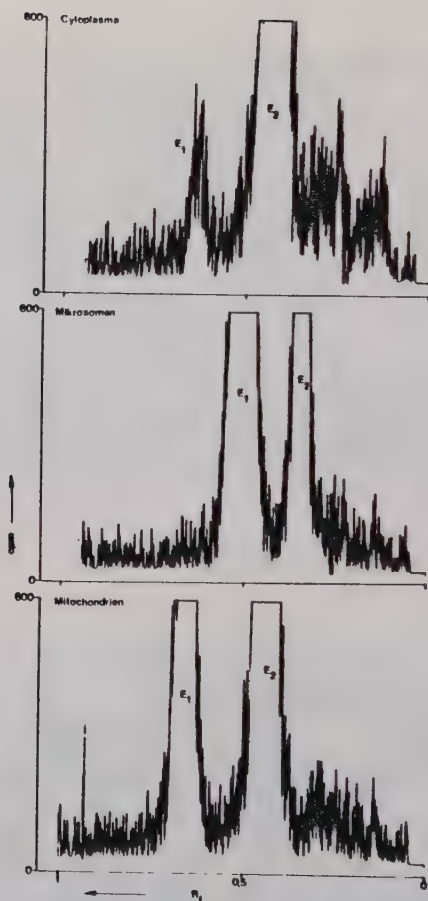


Abb. 2 Radiodünnschichtchromatogramme der Gesamtsteroiden, die nach Inkubation von ( $4\text{-}^{14}\text{C}$ )-Östradiol mit den nativen subzellulären Fraktionen extrahiert wurden. Inkubationsbedingungen und Einzelheiten zur Chromatographie siehe Legende zu Tab. 2.

$E_2$  = Östradiol,  $E_1$  = Östron  
 Abszisse =  $R_f$ -Wert, Ordinate = Impulszahl/min.

### 3.1.2. Die Verteilung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität innerhalb der Mitochondrienfraktion

Zur Lokalisierung der in den Mitochondrien gebundenen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität wurden die Mitochondrien nach der Methode von Schnaitman et al. (49) und Chan et al. (50) in innere und äußere Membranen, Intermembranraum und Matrix aufgetrennt und nach der Methode von Whereat et al. (51) weiter gereinigt. Anschließende Bestimmung der Markerenzymaktivität in den separierten Fraktionen zeigte eine gute Trennung der verschiedenen mitochondrialen Strukturen. Die Verteilung der 17 $\beta$ -HSD war analog der der Monoamin-Oxydase, dem Leitenzym der äußeren Membranen. Die Anreicherung betrug 193% gegenüber der spezifischen Aktivität der gesamten Mitochondrienfraktion (Tab.3).

|                      | Mito-<br>chondrien | Äußere<br>Membranen | innere<br>Membranen | Intermem-<br>branraum | Matrix |
|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|--------|
| Succinat-<br>DH      | 9,5                | 2,7                 | 27,3                | n. n.                 | n. n.  |
| Monoamin-<br>Oxydase | 2,3                | 10,4                | n. n.               | n. n.                 | n. n.  |
| Adenylat-<br>Kinase  | 8,7                | 2,3                 | n. n.               | 43,2                  | n. n.  |
| Glutamat<br>DH       | 15,8               | n. n.               | 2,3                 | 1,8                   | 22,7   |
| 17 $\beta$ -HSD      | 7,7                | 21,8                | 3,6                 | n. n.                 | n. n.  |

Tab. 3 Spezifische Aktivitäten der 17 $\beta$ -HSD und der Leitenzyme in den nach Schnaitman et al. (49), Chan et al. (50) und Whereat et al. (51) aufgearbeiteten submitochondrialen Fraktionen sekretorisch umgewandelten Humanendometriums. Die Aktivität der Leitenzyme wurde nach den im Abschnitt 2 genannten Verfahren, die 17 $\beta$ -HSD-Aktivität unter den in der Legende zu Tab. 2 beschriebenen Standardbedingungen bestimmt. Angegeben ist die spezifische Aktivität (nMol/mg Protein x 30 min) der Leitenzyme und der 17 $\beta$ -HSD.  
n. n. = nicht nachweisbar.

### 3.1.3. Die Verteilung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität innerhalb der Mikrosomenfraktion

Zur Separierung in rauhe und glatte Strukturen wurden die Mikrosomen einer 130 000 x g-Zentrifugation in einer diskontinuierlichen CsCl-Saccharose-Dichtegradienten unterworfen (52). Elektronenoptische Kontrollen zeigten, daß der Niederschlag an der Grenzfläche 0,25 M/1,3 M Saccharose glatte Strukturen enthielt, während im Sediment (1,3 M Saccharose) Polysomen, Ribosomen und einzelne mit Ribosomenbesatz versehene Vesikel zu finden waren. Die in den "Interfaces" suspendierten Fraktionen wurden nicht elektronenoptisch kontrolliert. Die in Tab. 4 zusammengefaßten Resultate zeigen, daß die mikrosomale 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in den glatten und rauhen Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist und ihre spezifische Aktivität in diesen Strukturen der Aktivität der zweimal gewaschenen Mikrosomenfraktion entspricht. Das deutet darauf hin, daß die mikrosomale 17 $\beta$ -HSD eng mit der Membran des ER verknüpft ist.

| Fraktion                      | 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase<br>(nMol/mg Protein x 30 min) |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Ausgangswert                  | 9,8                                                                    |
| 0,25 M Saccharose<br>(Zone 1) | 0,3                                                                    |
| Glatte Strukturen<br>(Zone 2) | 9,4                                                                    |
| 1,3 M Saccharose<br>(Zone 3)  | 0,5                                                                    |
| Rauhe Strukturen<br>(Zone 4)  | 10,1                                                                   |

Tab. 4 Spezifische Aktivität der 17 $\beta$ -HSD in den mikrosomalen Subfraktionen sekretorisch umgewandelten Human-Endometriums. Die Trennung der nativen Mikrosomenfraktion erfolgte durch Zentrifugation in einer diskontinuierlichen CsCl-Saccharose-Dichtegradienten nach der Methode von Dallner, Siekevitz und Palade (52). Die Reinheitskontrolle der Fraktionen erfolgte elektronenoptisch. Die Einzelheiten zur CsCl-Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und zur Elektronenmikroskopie sind in Abschnitt 2 ausführlich beschrieben. Die Aktivitätsbestimmung der 17 $\beta$ -HSD erfolgte unter Standardbedingungen, wie in der Legende zu Tab. 2 angegeben ist.

Zone 1: "Interface" in 0,25 M Saccharose

Zone 2: Niederschlag an der Grenzfläche 0,25 M/1,3 M Saccharose

Zone 3: "Interface" in 1,3 M Saccharose

Zone 4: Niederschlag in 1,3 M Saccharose

### 3.1.4. Nachweis der cytoplasmatischen Herkunft der löslichen 17 $\beta$ -HSD

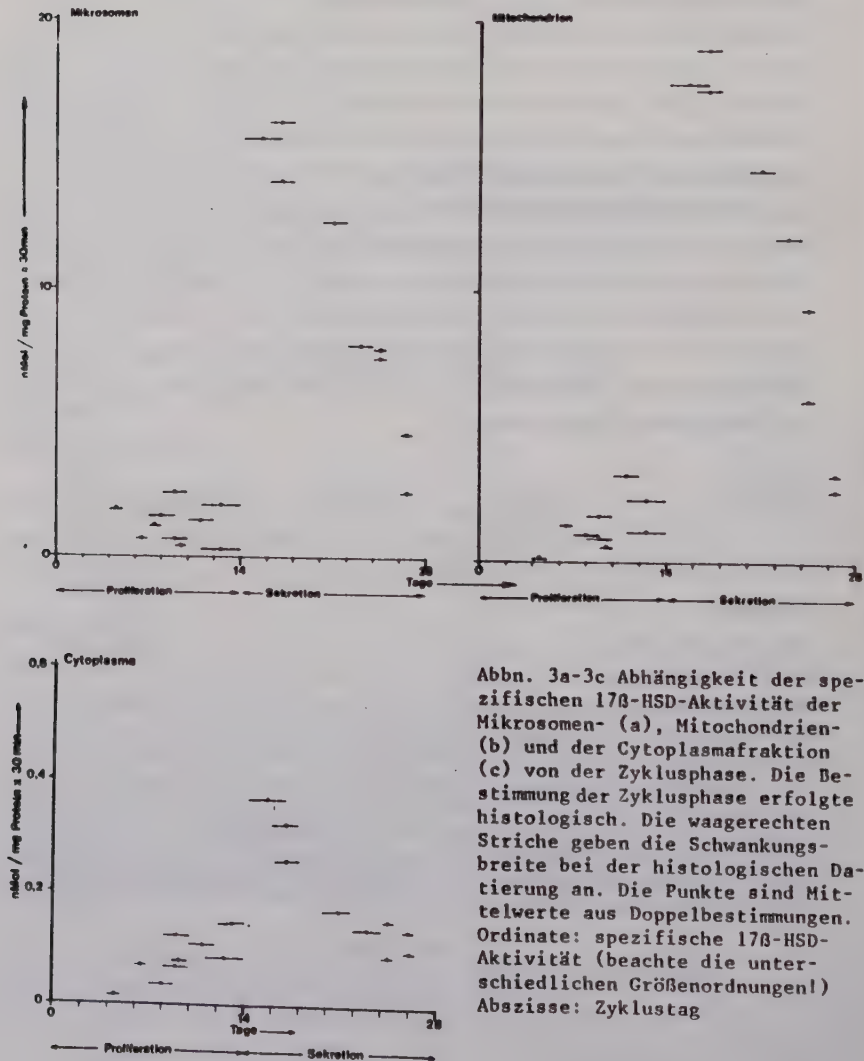
Für die in der Cytoplasmafraktion nachgewiesene 17 $\beta$ -HSD stellt sich die Frage, ob es sich um "echtes" lösliches Enzymprotein handelt, das seinen natürlichen Wirkort im Cytoplasma hat, oder um ein "niedermolekulares" Bruchstück der enzymaktiven endoplasmatischen Membran. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der 105 000 x g-Überstand mit Tris/HCl-Puffer im Verhältnis 1:4 verdünnt und einer Langzeitzentrifugation (158 000 x g für 30 Stunden) unterworfen (Einzelheiten sind in Abschnitt 2 beschrieben). Die 17 $\beta$ -HSD-Aktivität im Überstand betrug noch 27% der ursprünglichen Cytoplasmaaktivität, während der Hauptanteil im Sediment gefunden wurde (Tab.5). Die naheliegende Vermutung, daß diese sedimentierte Enzymaktivität aus dem ER stammt, wurde nicht bestätigt, da NADPH-Cytochrom-c-Reduktase als Leitenzym des ER im Sediment nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist deshalb naheliegend, daß es sich bei der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität nicht um extracytoplasmatische Fremdaktivität, sondern um echtes cytoplasmatisches Enzymprotein handelt, das durch die starken Beschleunigungskräfte der Langzeitzentrifugation und die niedrige Molalität des Puffermediums aggregierte und sedimentierte. Dieses Verhalten wurde bereits von Jarabak et al. (69) für die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD aus Humanplacenta beschrieben.

| Fraktion                               | Gesamt-Aktivität<br>(nMol/30 min) | Gesamt-Eiweiß<br>(mg) | 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase<br>(nMol/mg Protein x 30 min) |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Cytoplasma                             | 2,2                               | 11                    | 0,2                                                                     |
| Sediment nach 30 h<br>bei 158 000 x g  | 1,6                               | 7                     | 0,23                                                                    |
| Überstand nach 30 h<br>bei 158 000 x g | 0,6                               | 4                     | 0,15                                                                    |

Tab. 5 Aktivitätsverteilung der 17 $\beta$ -HSD im Sediment und im Überstand nach Langzeitzentrifugation (30 Stunden bei 158 000 x g) der Cytoplasmafraktion sekretorisch umgewandelten Human-Endometriums. Die spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität wurde unter den in der Legende zu Tab. 2 beschriebenen Standardbedingungen bestimmt. Einzelheiten zur Langzeitzentrifugation siehe Abschnitt 2.

### 3.2. Abhängigkeit der spezifischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität normalen Human-Endometriums von der Zyklusphase

In der Einleitung wurde die Frage aufgeworfen, ob die 17 $\beta$ -HSD mit der Regulierung der biologischen Östradiolaktivität in Zusammenhang steht. Die Abbn. 3a - 3c zeigen daß die spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität aller subzellulären Fraktionen, insbesondere der Mikrosomen- und der Mitochondrienfraktion in der Sekretionsphase gegenüber der Proliferationsphase deutlich erhöht ist:



Abbn. 3a-3c Abhängigkeit der spezifischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität der Mikrosomen- (a), Mitochondrien- (b) und der Cytoplasmafraktion (c) von der Zyklusphase. Die Bestimmung der Zyklusphase erfolgte histologisch. Die waagerechten Striche geben die Schwankungsbreite bei der histologischen Datierung an. Die Punkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Ordinate: spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität (beachte die unterschiedlichen Größenordnungen!) Abszisse: Zyklustag

### 3.3. Abhängigkeit der spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität verschieden hoch differenzierter Endometriumkarzinome vom Differenzierungsgrad des Karzinoms

Anhand von Untersuchungen fünfzehn verschieden hoch differenzierter Endometriumkarzinome wurde unter der in der Einleitung geschilderten Überlegung der Versuch unternommen, eine Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad und der spezifischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität herzustellen. Es zeigte sich, daß in allen untersuchten Geweben die spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in der Größenordnung der spezifischen Aktivität im gesunden Humanendometrium der Proliferationsphase lag. Diese Tendenz war in allen subzellulären Fraktionen zu beobachten (Tab. 6). Bei dem Vergleich mit dem Differenzierungsgrad des Tumors ließ sich darüberhinaus feststellen, daß Abnahme der Differenzierung des Endometriumkarzinoms zu einer Abnahme der spezifischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität führt.

| Histologie               | Alter der Patientin (Jahre) | spezif. Aktivität der 17 $\beta$ -HSD<br>(nmol/mg Protein x 30 min) |       |               |       |            |       |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------|---------------|-------|------------|-------|
|                          |                             | Mikrosomen                                                          |       | Mitochondrien |       | Cytoplasma |       |
|                          |                             | NAD                                                                 | NADP  | NAD           | NADP  | NAD        | NADP  |
| hoch differenziert       | 68                          | 7,3                                                                 | 1,4   | 2,4           | 1,1   | 0,25       | 0,08  |
|                          | 53                          | 3,3                                                                 | 1,3   | 1,8           | 0,9   | 0,13       | 0,08  |
|                          | 43                          | 6,4                                                                 | 0,89  | 3,5           | 0,24  | 0,16       | 0,05  |
|                          | 50                          | 4,3                                                                 | 1,3   | 3,8           | 1,2   | 0,8        | 0,21  |
|                          | 64                          | 5,6                                                                 | 1,8   | 11,4          | 3,5   | 1,8        | 0,8   |
| mittelhoch differenziert | 76                          | 2,0                                                                 | 0,3   | 0,23          | 0,05  | 0,13       | 0,05  |
|                          | 63                          | 1,6                                                                 | 0,23  | 0,35          | 0,13  | 0,05       | n. n. |
|                          | 63                          | 2,5                                                                 | 0,05  | 3,16          | 0,08  | 0,12       | 0,05  |
|                          | 56                          | 1,5                                                                 | 0,08  | 0,57          | 0,05  | 0,05       | 0,05  |
|                          | 63                          | 0,18                                                                | 0,05  | 0,08          | 0,05  | n. n.      | n. n. |
| un- differenziert        | 61                          | 0,22                                                                | 0,24  | 0,06          | 0,11  | 0,01       | 0,01  |
|                          | 72                          | 0,39                                                                | 0,05  | 0,3           | n. n. | n. n.      | n. n. |
|                          | 79                          | 0,08                                                                | n. n. | 0,6           | n. n. | 0,06       | 0,02  |
|                          | 73                          | 0,14                                                                | 0,08  | 0,13          | n. n. | 0,08       | 0,07  |
|                          | 69                          | 0,8                                                                 | n. n. | 1,5           | 0,6   | n. n.      | n. n. |

Tab. 6 Spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in den subzellulären Fraktionen verschieden hoch differenzierter Endometriumkarzinome. Die Aktivitätsbestimmung der 17 $\beta$ -HSD geschah unter den in der Legende zu Tab. 2 angegebenen Standardbedingungen.

n. n. = nicht nachweisbar

### 3.4. Charakterisierung der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD

Wegen der unterschiedlichen spezifischen Aktivität in den einzelnen Zyklusphasen wurden nur Enzympräparationen aus sekretorisch umgewandeltem Humanendometrium verwendet.

#### 3.4.1. Enzymmenge

Im Bereich von 0,1 bis 3 mg Protein pro Reaktionsansatz ( $\approx 0,73$  mg/ml) verhielt sich die Östronausbeute zu der eingesetzten Proteinmenge direkt proportional (Abb. 4).

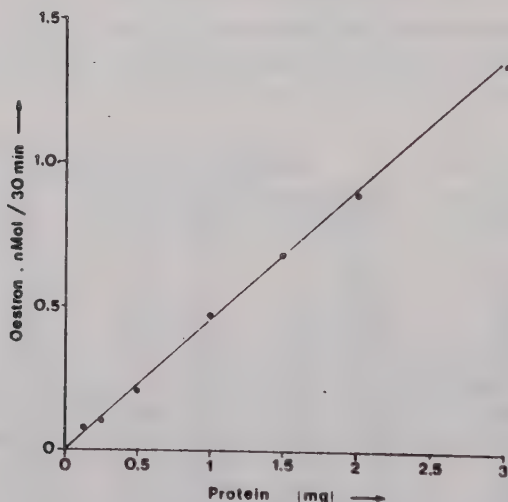


Abb. 4 Abhängigkeit der Transformation von Östradiol-17 $\beta$  zu Östron durch die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD von der Enzymmenge im Reaktionsansatz. Die Inkubationen erfolgten unter Standardbedingungen: (4- $^{14}$ C)-Östradiol-17 $\beta$ : 0,1  $\mu$ Ci (= 0,0018  $\mu$ M), inaktives Östradiol-17 $\beta$ : 10  $\mu$ M in 0,1 ml Propylenglykol (= Endkonzentration von 2,4%), NAD: 400  $\mu$ M, Enzymprotein, Tris/HCl-Puffer ad 4,1 ml; Inkubationszeit 30 min., Inkubationstemperatur 37°C.  
Ordinate: spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität

### 3.4.2. Zeit

Unter standardisierten Inkubationsbedingungen ließ sich eine lineare Beziehung zwischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität und Inkubationszeit im Bereich bis zu 40 Minuten feststellen (Abb. 5).

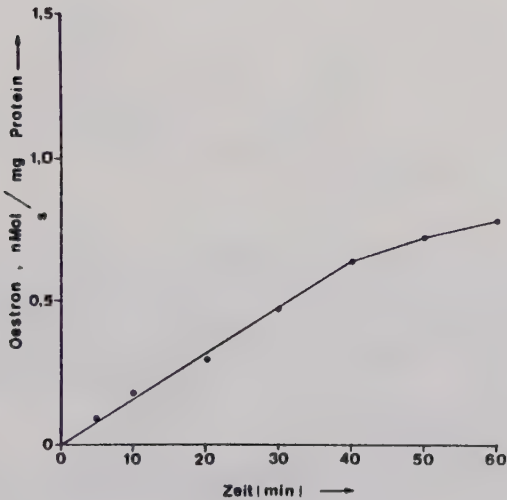


Abb. 5 Zeitlicher Verlauf der Oxydation von Östradiol-17 $\beta$  zu Östron durch die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD. Die Inkubationen erfolgten unter den in der Legende zu Abb. 4 beschriebenen Standardbedingungen, die Inkubationszeiten entsprachen den Werten in der Abbildung. Ordinate: gebildete Menge Östron pro mg Enzymprotein

### 3.4.3. Temperatur

Es zeigte sich, daß das Temperaturoptimum der 17 $\beta$ -HSD bei 42°C liegt. Von 15°C bis zum Temperaturoptimum erfolgte ein annähernd linearer Anstieg, bei höheren Temperaturen ein annähernd linearer Abfall der spezifischen Aktivität. Bei 60°C war die Östronausbeute nur noch sehr gering (Abb. 6).

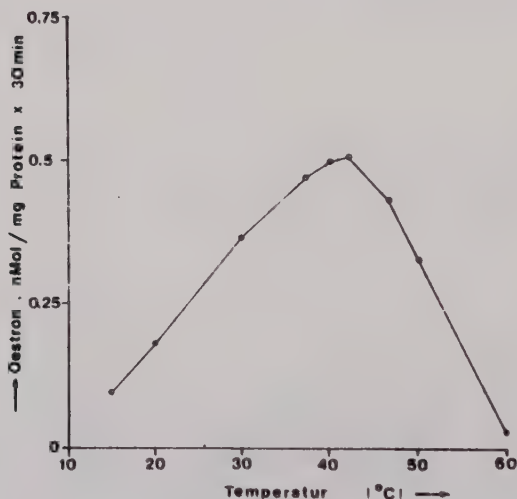


Abb. 6 Einfluß der Inkubationstemperatur auf die spezifische Aktivität der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD. Die Inkubationsbedingungen entsprachen den in der Legende zu Abb. 4 angegebenen Standardbedingungen; die Inkubationstemperaturen wurden den Werten in der Abbildung entsprechend verändert.

Ordinate: spezifische Aktivität der 17 $\beta$ -HSD

### 3.4.4. pH-Optimum

Das pH-Optimum der Oxydation von Östradiol-17 $\beta$  lag im Bereich von pH 9 bis 10, das der Reduktion von Östron zu Östradiol-17 $\beta$  im Bereich von pH 5,5 bis 6,5 (Abb. 7).

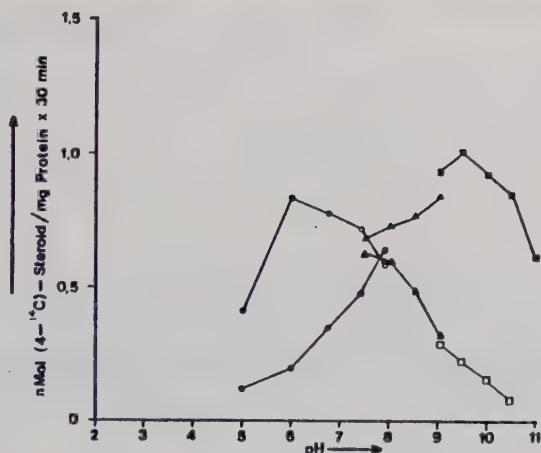


Abb. 7 Abhängigkeit der cytoplasmatischen 17β-HSD-Aktivität von der Zusammensetzung und der Wasserstoffionenkonzentration des Puffermediums. Gemessen wurde die Oxydation von Östradiol-17β zu Östron (volle Symbole) und die Reduktion von Östron zu Östradiol-17β (leere Symbole). Bei der Reduktion von Östron zu Östradiol wurden 0,1 μCi (4-<sup>14</sup>C)-Östron ( $\Delta$  0,002 μM) zusammen mit 10 μM nicht markiertem Östron eingesetzt. Als Puffermedien wurden verwendet:

- 0,15 M Ringer-Phosphat-Puffer
- ▲—▲ 0,2 M Tris/HCl-Puffer
- ◻—◻ 0,2 M Natrium-Borat/NaOH-Puffer

Die übrigen Inkubationsbedingungen entsprachen den in der Legende zu Abb. 4 angegebenen Standardbedingungen.

Ordinate: spezifische 17β-HSD-Aktivität

### 3.4.5. Substratspezifität

Die Bestimmung der Substratspezifität der cytoplasmatischen 17β-HSD wurde unter standardisierten Inkubationsbedingungen mit äquimolaren Mengen Ring-A-phenolischer Östrogene (Östradiol, Östron) und Ring-A-neutraler 4,5-ungesättigter C<sub>19</sub>-Steroide (Testosteron, Androstendion) durchgeführt (Tab. 7); die Reaktionsprodukte durch mikrochemische Analytik und nach dem Verfahren der ungekehrten Isotopenverdünnung identifiziert (s. Tab. 1). Unter oxydierenden wie reduzierenden Bedingungen war die spezifische Aktivität der löslichen 17β-HSD gegenüber den C<sub>18</sub>-Östrogenen am größten; Testosteron und Androstendion wurden in geringerem Umfang metabolisiert.

| eingesetztes Steroid | nachgewiesenes Reaktionsprodukt | spezifische Aktivität<br>(nMol/mg Protein x 30 min) |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Östradiol-17 $\beta$ | Östron                          | 0,47                                                |
| Östron               | Östradiol-17 $\beta$            | 0,22                                                |
| Testosteron          | Androstendion                   | 0,18                                                |
| Androstendion        | Testosteron                     | 0,08                                                |

Tab. 7 Oxydations- bzw. Reduktionsrate von Östradiol-17 $\beta$  und Testosteron bzw. Östron und Androstendion durch die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD. Bei den Inkubationen wurden jeweils 0,1 uCi (etwa 0,002  $\mu$ M) (4-<sup>14</sup>C)-Steroid sowie 10  $\mu$ M nicht radioaktiv markiertes Steroid eingesetzt. Die übrigen Inkubationsbedingungen entsprachen den in der Legende zu Abb. 4 angegebenen Standardbedingungen.

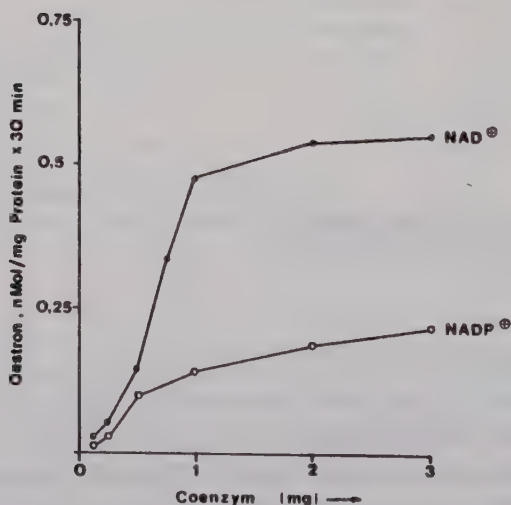


Abb. 8 Abhängigkeit der spezifischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität von der Art und Konzentration der wasserstoffübertragenden Coenzym. Als Coenzym wurden die Pyridinnucleotide NAD und NADP in der in der Abbildung angegebenen Menge eingesetzt. Die übrigen Inkubationsbedingungen sind in der Legende zu Abb. 4 angegeben.

Abszisse: mg Coenzym pro Ansatz (=4,1 ml)  
 Ordinate: spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität

### 3.4.6. Coenzymspezifität

Der Einfluß von NAD und NADP auf die Aktivität der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD wurde bei verschiedenen Konzentrationen untersucht und ist in Abb. 8 zusammengefaßt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit des Umsatzes von Östradiol nach Östron ist mit NADP als wasserstoffakzeptierendes Coenzym 1/3 so groß wie mit NAD.

### 3.4.7. $K_m$ -Wert und maximale Umsatzgeschwindigkeit

Die Abhängigkeit der Bildung von (4- $^{14}$ C)-Östron von der Substratkonzentration ist in Form der Lineweaver-Burk-Transformation in Abb. 9 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 7,4 und NAD als Coenzym betrug der  $K_m$ -Wert für Östradiol  $3,3 \times 10^{-6}$  M; die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) 0,23 nMol/mg Protein/10min.

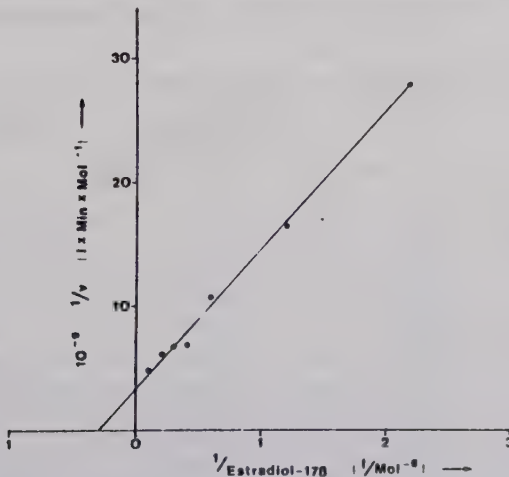


Abb. 9 Michaelis-Konstante und maximale Umsatzgeschwindigkeit als Maß für die Affinität der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD zu Östradiol-17 $\beta$ . Die beiden Größen wurden mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagrammes ermittelt. Die Substratkonzentrationen entsprachen den in der Abszisse angegebenen Werten für 1/Östradiol-17 $\beta$ , die Inkubationszeit betrug jeweils 10 min. Ubrige Inkubationsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 4

### 3.4.8. Wirkung verschiedener Substanzen auf die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD

Die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD wurde mit den in Tab. 8 aufgeführten Substanzen versetzt und für 5 Minuten ohne Substrat vorinkubiert. Vor der anschließenden Hauptinkubation wurde die Enzymaufbereitung nicht dialysiert. P-Chlormercuribenzoat in einer Konzentration von  $10^{-3}$  Mol/l bewirkte eine vollständige Hemmung der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD. Vorinkubation mit Cystein bewirkte eine Aktivitätssteigerung um etwa 10% ( $10^{-5}$  Mol/l) bzw. 2% ( $10^{-3}$  Mol/l). Die geringere Aktivitätssteigerung bei höherer Cysteinkonzentration mag ihre Ursache in einer Maskierung von Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum des Enzymmoleküls haben. Zinkionen in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M steigerten im Gegensatz zu anderen Schwermetallionen die Aktivität der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD um 11%. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Vallee et al. (70-72) und Langer et al. (73), die darauf hinwiesen, daß Zink ein wesentlicher Bestandteil einiger Dehydrogenasen ist. Bei einer Zinkkonzentration von  $10^{-3}$  M trat eine geringgradige Hemmung ein. Durch Kupfer ( $10^{-3}$  M) wurde die 17 $\beta$ -HSD vollständig inaktiviert.  $10^{-3}$  M Magnesium hemmte die Aktivität zu 19% und war fast ohne Wirkung in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M.

| zugesezte<br>Verbindung    | Endkonzentration<br>(Mol/l) | spezifische<br>Aktivität<br>(nMol/mg Pro-<br>tein x 30 min) | Änderung gegenüber<br>dem Kontrollwert<br>(Hemmung in %) |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| keine                      | -----                       | 0,47                                                        | -----                                                    |
| P-Chlormer-<br>curibenzoat | $10^{-3}$                   | -----                                                       | 100                                                      |
| Cystein                    | $10^{-3}$                   | 0,48                                                        | + 2,1                                                    |
|                            | $10^{-5}$                   | 0,52                                                        | +10,6                                                    |
| Zn <sup>++</sup>           | $10^{-3}$                   | 0,43                                                        | 8,5                                                      |
|                            | $10^{-5}$                   | 0,53                                                        | +11,0                                                    |
| Mg <sup>++</sup>           | $10^{-3}$                   | 0,38                                                        | 19,1                                                     |
|                            | $10^{-5}$                   | 0,46                                                        | 2,1                                                      |
| Cu <sup>++</sup>           | $10^{-3}$                   | -----                                                       | 100                                                      |

Tab.8 Wirkung verschiedener Substanzen auf die spezifische Aktivität der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD. Das cytoplasmatische 17 $\beta$ -Enzym wurde unter Zugabe oben angegebener Verbindungen für jeweils 5 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die spezifische Aktivität ermittelt. Die Inkubationen zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurden unter Einsatz eines Aliquots der gesamten Enzymsuspension, die also noch die entsprechenden Substanzen enthielt, durchgeführt. Ansonsten entsprachen die Inkubationsbedingungen den in der Legende zu Abb. 4 angegebenen Standardbedingungen.

### 3.4.9. Inaktivierung durch Kältebehandlung

Die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD wurde unter Verwendung glycerinfreier Medien, wie im Abschnitt 2 beschrieben, dargestellt und anschließend verschiedenen Temperaturen ausgesetzt (4°C, 15°C, 25°C). In bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und ihre spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität ermittelt. Wie Abb. 11 zeigt, war der Aktivitätsverlust bei Kältebehandlung bis zu einer Stunde gering, während längere Kälteexposition eine deutliche Inaktivierung zur Folge hatte, besonders bei niedrigen Temperaturen.

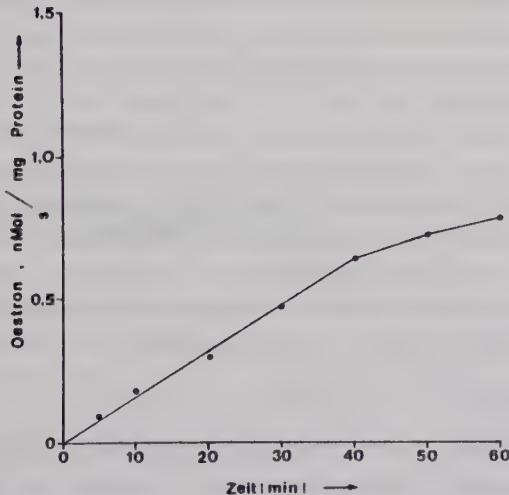


Abb. 11 Inaktivierung der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD durch Kältebehandlung. Die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD wurde wie im Abschnitt 2 beschrieben dargestellt. Die hierbei verwendeten Medien enthielten jedoch kein Glycerin. Anschließend wurden Aliquots des aufbereiteten Enzyms Temperaturen von 4°C, 15°C und 25°C ausgesetzt. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und unter den in der Legende zu Abb. 4 angegebenen Standardbedingungen auf ihre 17 $\beta$ -HSD-Aktivität geprüft.

### 3.4.9.1. Schutzwirkung verschiedener Substanzen (NAD, NADP, Östradiol und Glycerin) gegen die Kälteinaktivierung (4°C) der cytoplasmatischen 17β-HSD

Unter Verwendung glycerinfreier Medien wurde die cytoplasmatische 17β-HSD aufbereitet. Anschließend wurde NAD, NADP, Östradiol oder Glycerin in den in Tab.9 angegebenen Konzentrationen zugesetzt und bei 4°C aufbewahrt. Nach 1, 12 und 24 Stunden wurden Aliquots der 17β-HSD-Suspensionen auf ihre spezifische Aktivität geprüft. Es zeigte sich, daß alle eingesetzten Substanzen den Aktivitätsverlust der cytoplasmatischen 17β-HSD stark herabsetzten (70). Während ohne Zusatz nach 24stündiger Kältebehandlung nur noch 3% der Ausgangsaktivität nachzuweisen war, betrug die Aktivität bei Zusatz von 20% Glycerin nach 24 Stunden noch 89% des Ausgangswertes. Östradiol (10 µM) war ähnlich wirkungsvoll, während mit NAD, NADP (jeweils 10 µM) und 10% Glycerin der Aktivitätsverlust nach 24 Stunden etwa bei 20-30% lag (Tab.9).

| zugesetzte<br>Verbindung | Endkonzentration | Restaktivität in % des Ausgangswertes<br>nach Kältebehandlung bei 4°C für |         |         |
|--------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
|                          |                  | 1 Std.                                                                    | 12 Std. | 24 Std. |
| keine                    | -----            | 96                                                                        | 8       | 3       |
| NAD <sup>+</sup>         | 10 µM            | 98                                                                        | 76      | 68      |
| NADP <sup>+</sup>        | 10 µM            | 100                                                                       | 88      | 82      |
| Östradiol-17β            | 10 µM            | 100                                                                       | 92      | 88      |
| Glycerin                 | 10 %             | 100                                                                       | 68      | 61      |
| Glycerin                 | 20 %             | 100                                                                       | 82      | 79      |

Tab. 9 Schutzeffekt verschiedener Verbindungen gegen die Kälteinaktivierung der cytoplasmatischen 17β-HSD. Die Cytoplasmadarstellung geschah wie in Abschnitt 2 beschrieben mit der Ausnahme, daß die bei der Aufbereitung verwendeten Medien kein Glycerin enthielten. Statt dessen wurde ihnen NAD, NADP, Östradiol-17β oder Glycerin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Nach 1, 12 und 24 Stunden wurden Proben entnommen und auf ihre spezifische 17β-HSD-Aktivität geprüft. Die Inkubationsbedingungen hierbei entsprachen den in der Legende zu Abb. 4 beschriebenen Standardbedingungen. Die "Endkonzentration" der verschiedenen Verbindungen bezieht sich auf die aufbereitete Cytoplasmafraktion, nicht auf die Inkubationsansätze.

#### 4. Diskussion

Es ist seit langem bekannt, daß die Veränderungen des Human-Endometriums während des weiblichen Zyklus abhängig sind von den wechselnden Einflüssen der Östrogene und Gestagene. Die Frage nach dem molekularen Wirkungsmechanismus ist dagegen bis heute noch nicht endgültig geklärt.

Nach den heutigen Erkenntnissen vollzieht sich die Wirkung der Östrogene, die im wesentlichen die Proliferationsphase steuern, in drei aufeinanderfolgenden Schritten: 1. Einstrom in die Target-Zelle und Koppelung an ein cytoplasmatisches Rezeptorprotein mit hoher Substratspezifität und niedriger Bindungskapazität, Translokation des Östrogen-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern unter Energieverbrauch, 3. Assoziation des Komplexes mit bestimmten Chromatinabschnitten im Sinne einer "Demaskierung" spezifischer Strukturgene, welche durch Bildung entsprechender m-RNS die Proteinsynthese in Gang setzen (9, 17-31). Da das Östradiol-Rezeptorprotein - wie andere Rezeptormoleküle - neben niedriger Bindungskapazität eine hohe Substratspezifität besitzt, andererseits aber die biologische Östradiolwirkung nicht parallel läuft zu der Östradiolkonzentration im Serum, mußte eine zyklische Änderung der Konzentration oder der Affinität der Partner in der Target-Zelle vermutet werden. Unter diesem Aspekt erscheint es sinnvoll, östradiolumsetzende intrazelluläre Enzymaktivitäten für die zykluskonformen Schwankungen der biologischen Östradiolaktivität verantwortlich zu machen.

Ein Östradiolmetabolismus in der Zelle des Human-Endometriums wurde erstmals von Ryan und Engel (36) beschrieben in Form einer reversiblen Oxydoreduktion von Östradiol und Östron, dessen biologische Wirksamkeit weit weniger ausgeprägt ist als die des Östradiols. Diese Oxydoreduktion wird katalysiert durch die 17 $\beta$ -HSD:

$$\text{Östradiol} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons{17\beta\text{-HSD}} \text{Östron} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Auch Sweat et al. (37, 38) und Collins et al. (39) fanden 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten im Human-Endometrium und wiesen auf mögliche Zusammenhänge zwischen der 17 $\beta$ -HSD und der biologischen Östradiolaktivität hin.

In weiterführenden Untersuchungen zeigten Siiteri et al. (30), daß die 17 $\beta$ -HSD in verschiedenen subzellulären Strukturen des proliferativen Human-Endometriums vorhanden ist, wobei in den einzelnen Kompartimenten

starke Unterschiede der spezifischen Aktivität zu beobachten waren. 1974 wurde durch Tseng und Gurpide erstmals nachgewiesen, daß die 17 $\beta$ -HSD im Human-Endometrium starken Aktivitätsschwankungen in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus unterliegt (40).

Siiteri schilderte nicht die Methodik der Trennung der einzelnen Zellorganellen und ging auch nicht auf die Reinheitskontrolle der getrennten Fraktionen ein. Weiterhin bezogen sich die Untersuchungen nur auf während der Proliferationsphase entnommenes Gewebe, während Tseng und Gurpide keine Trennung der subzellulären Kompartimente vornahmen, sondern den 800 x g-Überstand einsetzten. Deshalb sind die Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit wird über eine vergleichende Untersuchung der spezifischen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in den verschiedenen Zellkompartimenten des Human-Endometriums während der Proliferations- und Sekretionsphase berichtet, wobei der Reinheitsgrad der getrennten subzellulären Fraktionen durch elektronenoptische Aufnahmen und Markerenzymbestimmungen kontrolliert wurde. Die spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivität wurde unter standardisierten und damit direkt vergleichbaren Bedingungen ermittelt.

Unsere Ergebnisse zeigten, daß - in Übereinstimmung mit Siiteri et al. - die 17 $\beta$ -HSD in allen Zellorganellen vorhanden ist, wobei die spezifische Aktivität jedoch in den einzelnen subzellulären Kompartimenten sehr unterschiedlich ist: Während die Mitochondrien und die Mikrosomenfraktion hohe spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten aufweisen, ist sie in der Cytoplasmafraktion und in den Kernen 25 bis 50mal niedriger (Tab. 2). In den partikulären Strukturen (Mikrosomen und Mitochondrien) ist sie insbesondere in den glatten und rauhen Anteilen des Endoplasmatischen Retikulums sowie in den mitochondrialen Außenmembranen lokalisiert. Die lösliche 17 $\beta$ -HSD scheint in der Cytoplasma-Fraktion an Proteine gekoppelt zu sein bzw. eine Aggregation von Proteinen auszulösen. Enzyme dieser Art, die an Proteine gebunden sind bzw. als Aggregate vorliegen, zeichnen sich im Vergleich zu den "strukturgebundenen" durch niedrigere spezifische Aktivitäten aus (74). Bei dem Vergleich mit der bereits intensiv untersuchten 17 $\beta$ -HSD aus Humanplacenta ergab sich, daß die subzelluläre Verteilung des Enzyms im Human-Endometrium der in der Humanplacenta weitgehend entspricht (74).

Die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD aus sekretorisch umgewandeltem Human-Endometrium ergab eine Reihe von Gemeinsamkeiten mit der bereits intensiv untersuchten 17 $\beta$ -HSD aus Humanplacenta (69, 75-77): Beide Enzympräparationen katalysieren die reversible Oxydoreduktion von Östradiol und Östron bzw. Androstendion und Testosteron und benötigen NAD(H) oder NADP(H) als Wasserstoffakzeptor unter Bevorzugung von NAD(H). Der  $K_m$ -Wert für Östradiol liegt in der gleichen Größenordnung, beide besitzen eine ausgeprägte Kältesensibilität, die durch Zugabe der Pyridinnucleotide NAD oder NADP, von Substrat oder von Glycerin stark herabgesetzt wird. Auch die Aktivitätssteigerung durch  $Zn^{++}$ -Ionen und die Hemmbarkeit durch andere Schwermetallionen sowie die offensichtliche Existenz von Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum des Moleküls sind bei den Enzymen gemeinsam.

In Übereinstimmung mit Tseng und Gurpide (40) fanden wir ferner eine signifikant höhere spezifische Aktivität der 17 $\beta$ -HSD bei Verwendung von Enzympräparationen aus der Sekretionsphase verglichen mit der Proliferationsphase. Dieser Aktivitätsunterschied zeigte sich in allen Zellkompartimenten und belief sich auf das 3-10fache der Proliferationsphase.

Es stellt sich die Frage, welche Ursachen dem "repressing effect" der 17 $\beta$ -HSD in der ersten Zyklushälfte bzw. der Aktivitätszunahme in der Sekretionsphase zugrunde liegen. Vier Möglichkeiten müssen hierzu in Betracht gezogen werden:

1. unterschiedliche Syntheserate der 17 $\beta$ -HSD,
2. chemische Modifikation des Enzymmoleküls während der Proliferationsphase und damit Verlust der katalytischen Wirksamkeit,
3. Unterschiede in der räumlichen Struktur des Enzymmoleküls während der prä- und postovulatorischen Phase,
4. Synthese bestimmter "Inhibitorproteine" während der ersten Zyklushälfte. Die inhibitorische Wirkung bestimmter sexualhormonbindender Globuline auf die cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD aus Humanplacenta konnte bereits von Geithövel und Breuer (78) nachgewiesen werden. Über ähnliche Befunde an Hühnerleber und nicht geschlechtsreifen Ratten berichteten Arias und Warren (79) und Nunez et al. (80).

Die zeitliche Übereinstimmung zwischen dem Anstieg des Progesteron-Serumspiegels und der intrazellulären 17 $\beta$ -HSD-Aktivität läßt vermuten, daß Progesteron über den Steroidhormon-Rezeptormechanismus Einfluß auf eine de-novo-Synthese dieses Enzyms nimmt. Darüberhinaus zeigen jüngste Untersuchungen von Tseng und Gurpide (81) an Humanendometrium-Zellkulturen, daß ausschließlich nach Zugabe von Progesteron zum Kulturmedium ein 17 $\beta$ -HSD-Aktivitätsanstieg in der Endometriumzelle zu beobachten ist. Diese Beobachtung, daß durch hochaktive synthetische Gestagene eine Aktivierung der endometrialen 17 $\beta$ -HSD ausgelöst werden kann, steht im Gegensatz zu einer Mitteilung von Jütting (82), die die Induktion der im Myometrium von Kaninchen lokalisierten 17 $\beta$ -HSD nach Östrogen-Gabe beschreibt.

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Frage nach der physiologischen Funktion der in ihrem Aktivitätspegel zyklisch-gesteuerten 17 $\beta$ -HSD: Die physiologische Funktion der hohen 17 $\beta$ -HSD-Aktivität in der zweiten Zyklushälfte könnte begründet liegen in einem synergistischen Effekt zusammen mit dem postovulär in die Erfolgsorgan-Zelle einströmenden Progesteron, das als natürlicher Gegenspieler des Östradiols eine Blockierung des Östradiol-bedingten proliferativen Stimulus in der zweiten Zyklushälfte bewirkt. Das als synergistischer Effekt bezeichnete Zusammenwirken von 17 $\beta$ -HSD und Progesteron-Rezeptormechanismus würde einen wirkungsvollen "Schutzmechanismus" gegen die "Induktionswirkung" biologisch-aktiven Östradiols in der Endometriumzelle darstellen; zumal aufgrund von Untersuchungen an Ratten (16), Mäusen (83) und Kaninchen (82) bekannt ist, daß ausschließlich Östradiol die für die Östrogene typischen uterospezifischen Effekte auszulösen vermag, dagegen Östron als biologisch weniger aktive Verbindung erst in die biologisch hochaktive Form (Östradiol) umgewandelt werden muß. Ferner liefern die Untersuchungen von Siiteri et al. (30) Argumente dafür, daß in Human-Endometrium eine Translokation des cytoplasmatischen Östron-Rezeptorkomplexes vom Cytoplasmaraum in den Zellkern, den Wirkungsort der Steroidhormone in der Erfolgsorgan-Zelle, nicht möglich ist - wahrscheinlich als Folge einer Instabilität des Östron-Rezeptorkomplexes aufgrund einer hohen Dissoziationskonstante.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach dem Zeitpunkt des enzymatischen Angriffes, nachdem Östradiol von der Erfolgsorgan-Zelle aufgenommen wurde. Zwei Möglichkeiten bieten sich an:

1. vor der Koppelung von Östradiol mit dem spezifisch bindenden cytoplasmatischen Rezeptorprotein und
2. nachdem Östradiol seine hormonale Mission im Zellkern erfüllt hat. (Entweder durch Oxidation des im nuklearen Östradiol-Rezeptorkomplex fixierten Substrates - hierdurch könnte die Bindung zwischen Hormon und Rezeptor gelöst und die Eliminierung des biologisch-aktiven Östradiols aus dem Zellkern begünstigt werden - oder nach Dissoziation des nuklearen Östradiol-Rezeptorkomplexes in freies Rezeptorprotein und freies Östradiol).

Beide Hypothesen sind wahrscheinlich, was durch den Nachweis gestützt wird, daß die 17 $\beta$ -HSD in der Endometrium-Zelle sowohl in der Cytoplasma-Fraktion als auch Kern-gebunden lokalisiert ist. Sicher ist aber, daß durch beide Vorgänge dem intrazellulären Kreislauf biologisch-aktives Östradiol entzogen wird, also daß durch beide Vorgänge eine Kontrolle der Dauer und Intensität der Hormonwirkung durch Inaktivierung des Hormons im Erfolgsorgan selbst erfolgen kann.

Die Untersuchungen mit Enzym-Präparationen aus Endometrium-Karzinomen zeigten, daß eine enge Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumorzelle und der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität besteht: Abnahme des Differenzierungsgrades war mit einer Abnahme der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität korreliert. In entdifferenzierten Tumorformen wurden Werte erreicht, die um den Faktor 100 niedriger lagen als in Normalgewebe der Sekretionsphase. Dieser Befund deutet an, daß in neoplastisch-transformiertem Endometrium-Gewebe, das in der histologischen Analyse die Zeichen einer "entarteten" Östradiol-Aktivität zeigt, dieser "Schutzmechanismus" gegen biologisch-wirksames Östradiol gestört ist.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß eine langdauernde und hochdosierte Gestagen-Therapie bei Karzinomträgerinnen zu einer Stimulierung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität im Primär-Tumor führt. Dieser Gestagen-bedingte "Induktionseffekt" ist aber im wesentlichen

auf hochdifferenzierte Tumorformen beschränkt. Hochdifferenzierte Endometrium-Karzinome, die - wie die klinische Erfahrung zeigt (84-102) - eine Gestagen-Therapie mit einer zeitlich begrenzten Regression des Primärtumors und seiner Metastasen beantworten, reagieren also im Stoffwechselverhalten ähnlich wie die normale Matrix. Unklar ist, ob der Gestagen-Effekt über eine Blockierung hypophysärer Faktoren wirkt oder durch direkten Angriff am Progesteron-Rezeptor-mechanismus zustande kommt. Trifft die zweite Möglichkeit zu, wäre die 17 $\beta$ -HSD-Aktivitätssteigerung nach Gestagen-Gabe 1. ein Indikator für ein funktionstüchtiges Progesteron-Rezeptorsystem und 2. könnte die Höhe der Aktivitätszunahme der 17 $\beta$ -HSD als ein Maß für die endogene Progesteron-Rezeptoraktivität (-konzentration) angesehen werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in Human-Endometrium und Endometrium-Karzinomen die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) untersucht und der Östradiol-Metabolismus in Beziehung zu der Funktion der Sexualhormone im Erfolgsorgan gesetzt.

1. Es zeigte sich, daß der für die zweite Zyklushälfte charakteristische Wechsel in den funktionellen Abläufen und in der Endometrium-Morphologie verbunden ist mit einem wirkungsvollen Wechsel im Östradiol-Metabolismus.

Die Stoffwechsellage von Normal-Endometrium der ersten Zyklushälfte zeichnete sich durch eine niedrige spezifische Aktivität der 17 $\beta$ -HSD aus; für Gewebeproben, die der Sekretionsphase entnommen wurden, traf das Gegenteil zu.

2. Die Stoffwechsellage in entdifferenzierten Tumorformen entsprach der von Normalgewebe der Proliferationsphase, was mit dem histologischen Charakter neoplastisch transformierten Endometrium-Gewebes, das die Zeichen einer "entarteten" Östradiol-Aktivität zeigt, übereinstimmt. Außerdem zeigten die Untersuchungen mit Enzympräparationen aus Endometrium-Karzinomen, daß eine enge Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumorzelle und den spezifischen Aktivitäten der sexualhormonumsetzenden Enzyme besteht: Abnahme des Differenzierungsgrades führte zu einer Abnahme der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität.

3. Als Hauptmetabolit des Östradiol-Stoffwechsels erwies sich Östron; neben Östron entstanden höher-polare Metabolite (<2% der gebildeten Östromenge), deren eindeutige Identifizierung aufgrund der Instabilität und der geringen Substanzmenge nicht möglich war. Die Identifizierung der Steroid-Metabolite erfolgte durch dünn-schicht-chromatographische Analyse, mikrochemische Reaktionen und nach dem Verfahren der umgekehrten Isotopenverdünnung.

4. Die 17 $\beta$ -HSD war in "löslicher" Form in der Cytoplasma-Fraktion lokalisiert und als "strukturgebundenes" Enzym mit dem Endoplasmatischen Retikulum, der Außenmembran der Mitochondrien und der Kernfraktion assoziiert. Die spezifische Aktivität der "strukturgebundenen"

17 $\beta$ -HSD lag 10- bis 50fach über der des "löslichen" Enzyms.

5. Die im Cytoplasma von Normalgewebe lokalisierte 17 $\beta$ -HSD wurde durch enzymkinetische Parameter (pH- und Temperaturoptimum, Stabilität,  $K_m$ -Wert, Substrat- und Coenzym-spezifität, Einfluß von Metallionen und SH-Gruppen blockierender Verbindungen) charakterisiert. Die Ähnlichkeiten in den enzymcharakterisierenden Parametern zwischen der "löslichen" 17 $\beta$ -HSD und den in den Zellorganellen gebundenen 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten lassen vermuten, daß es sich um ähnliche, möglicherweise um identische 17 $\beta$ -Enzyme handelt.
6. Aufgrund der erhobenen Befunde wird diskutiert, daß durch die 17 $\beta$ -HSD des Human-Endometriums die Dauer und Intensität der Östradiolwirkung in diesem Erfolgsorgan kontrolliert werden kann.

## 6. Literatur

1. Lauritzen, C.: Arch. Gynäk. 191, 122 (1958)
2. Pepper, H., Lindsay, St.: Fertil. Steril. 9, 551 (1958)
3. Haller, J.: Acta Endocr. 67, 131 (1962)
4. Schreiner, W. E. in: Klinik der inneren Sekretion, Hrsg. Labhart, A., 2. Aufl., 557 (1971)
5. Stoeckel, W. in: Stoeckels Lehrbuch der Gynäkologie, 15. Aufl., 243 (1967)
6. Ahrens, C. A., Prinz, G.: Gebh. und Frauenheilk. 17, 475 (1957)
7. Mueller, G. C., Herranen, A., Jervell, K.: Rec. Progr. Horm. Res. 8, 95 (1958)
8. Means, A. R., Hamilton, T. H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 56, 1594 (1966)
9. Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D., Notides, A.: Rec. Progr. Horm. Res. 24, 45 (1968)
10. Hamilton, T. H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 49, 373 (1963)
11. Hamilton, T. H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 51, 83 (1964)
12. Burzako, J. M.: Zbl. Gynäk. 78, 1986 (1956)
13. Noyes, R. W., Hertig, A. T., Rock, J.: Fertil. Steril. 1, 3 (1950)
14. Moricard, F.: Gynéc. et Obstét. 63, 203 (1964)
15. Philippe, E., Ritter, J., Gandar, R.: Gynéc. et Obstét. 65, 315 (1966)
16. Jensen, E. V., Jacobson, H. T.: Rec. Progr. Horm. Res. 18, 387 (1962)
17. Jensen, E. V., DeSombre, E. R.: Ann. Rev. Biochem. 41, 203 (1972)
18. Jensen, E. V., DeSombre, E. R.: Science 182, 126 (1973)
19. Williams-Ashman, H. G., Reddi, A. H.: Ann. Rev. Physiol. 33, 31 (1971)
20. Means, A. R., O'Malley, B. W.: Metabolism 21, 357 (1972)
21. Bresciani, F., Nola, E., Sica, V., Puca, G. A.: Federation Proceedings 32/11, 2126 (1973)
22. Toft, D., Gorski, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 55, 1574 (1966)
23. Korenman, S. G., Rao, B. R.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 61, 1028 (1968)
24. Brush, M. G., Taylor, R. W., King, R. J. B.: J. Endocr. 39, 599 (1967)
25. Wyss, R. H., Heinrichs, W. L., Hermann, W. L.: J. clin. Endocr. 28, 1227 (1968)
26. Evans, L. H., Hähnel, R.: J. Endocr. 50, 209 (1971)
27. Evans, L. H., Hähnel, R.: J. Endocr. 56, 503 (1972)
28. Robertson, D. M., Mester, J., Beilby, J., Steele, S. J., Kellie, A. E.: Acta endocr. 68, 534 (1971)

29. Mc Guire, J. L., Bariso, C. D., Fuller, B. S., Mc Elrath, T. G., Delahunte, J. M.: J. clin. Endocr. 34, 243 (1972)
30. Siiteri, P. K., Ashby, R., Schwartz, B., Mc Donald, P. C.: J. Steroid Biochem. 3, 459 (1972)
31. Hähnel, R., Twaddle, E., Ratajczak, T.: J. Steroid Biochem. 4, 21 (1973)
32. Harris, G. S.: Nature New Biol. 231, 246 (1971)
33. Toft, D. O.: J. Steroid Biochem. 3, 515 (1972)
34. King, R. J., Gordon, J.: Nature (London) 240, 185 (1972)
35. Jensen, E. V., De Sombre, E. R.: Ann. Rev. Biochem. 41, 203 (1972)
36. Ryan, K. J., Engel, L. L.: Endocrinology 52, 287 (1953)
37. Sweat, M. L., Young, R. B.: Biochim. Biophys. Acta 296, 189 (1973)
38. Sweat, M. L., Young, R. B., Bryson, M. J.: Endocrinology 81, 167 (1967)
39. Collins, W. P., Mansfield, M. D., Bridges, C. E., Somerville, J. F.: Biochem. J. 113, 399 (1969)
40. Tseng, L., Gurpide, E.: Endocrinology 94, 419 (1974)
41. Hausknecht, R. V., Gusberg, S. B.: Americ. Journal of Obstetrics and Gynecology 116, 7, 981 (1973)
42. Sherman, A. J., Woolf, R. B.: Americ. Journal of Obstetrics and Gynecology 77, 233 (1959)
43. Dockerty, M. B., Mussey, E.: Americ. Journal of Obstetrics and Gynecology 61, 147 (1951)
44. Greene, J. W.: Americ. Journal of Obstetrics and Gynecology 74, 31 (1957)
45. Meissner, W. A., Sommers, S. C., Sherman, G.: Cancer 10, 500 (1957)
46. Gusberg, S. B.: Obstet. Gynecol. 30, 287 (1962)
47. O'Malley, B. W., Toft, D. O.: J. biol.Chem. 246, 1117 (1971)
48. Brown, D. H.: Biochim. Biophys. Acta 162, 152 (1968)
49. Schnaitman, C., Erwin, V. G., Greenawalt, J. W.: J. Cell. Biol. 32, 719 (1967)
50. Chan, T. L., Greenawalt, J. W., Pedersen, P. L.: J. Cell. Biol. 45, 291 (1970)
51. Whereat, A. F., Orishimo, M. W., Nelson, J., Philips, S. J.: J. Biol. Chem. 244, 6498 (1969)
52. Dallner, G., Siekevitz, P., Palade, G. E.: J. Cell. Biol. 30, 73 (1966)
53. Zaffaroni, A., Burton, R. B.: J. Biol. Chem. 193, 749 (1951)

54. Connell, G. M., Eik-Nes, K. B.: Steroids 12, 507 (1968)
55. Lieberman, S., Katzenellenbogen, E. R., Schneider, R., Studer, P. E., Dobriner, K.: J. Biol. Chem. 205, 87 (1953)
56. Bücher, T., Lutz, W., Pelle, D. in: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiol. und pathol. chem. Analyse, Vol. VIA, Springer-Verlag, 292 (1964)
57. Arrigoni, O., Singer, T. P.: Nature (London) 193, 1256 (1962)
58. Omura, T., Takesue, S.: J. Biochem. 67, 249 (1970)
59. Mahler, H. R., Hübscher, G., Baum, H.: J. biol. Chem. 216, 625 (1955)
60. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S., de Duve, C.: J. Cell. Biol. 37, 482 (1968)
61. Schnaitman, C., Greenawalt, J. W.: J. Cell. Biol. 38, 158 (1968)
62. Bergmeyer, H. V. in: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie/Weinheim, 752 (1962)
63. Burton, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
64. Ceriotti, G.: J. biol. Chem. 214, 59 (1955)
65. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: J. biol. Chem. 192, 265 (1951)
66. Beisenherz, G., Boltze, H., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
67. Karnowsky, M. J.: J. Cell. Biol. 27, 137A (1965)
68. Spurr, A. R.: J. Ultrastruct. Res. 26, 31 (1969)
69. Jarabak, J., Seeds, A. E., Talalay, P.: Biochemistry 5, 1269 (1966)
70. Vallee, B. L., Neurath, H.: J. biol. Chem. 217, 253 (1955)
71. Vallee, B. L., Hoch, F. L., Adelstein, S. J., Wacker, W. E. C.: J. Am. Chan. Soc. 78, 5879 (1956)
72. Vallee, B. L., Hoch, F. L.: J. biol. Chem. 225, 185 (1957)
73. Langer, L. J., Engel, L. L.: J. biol. Chem. 233, 583 (1958)
74. Pollow, K., Sokolowski, G., Grunz, H., Pollow, B.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 501 (1974)
75. Nunez, E., Savu, L., Engelmann, F., Benassayaz, C., Crepy, O., Jayle, M. F.: C. R. Acad. Sci. (Paris) 273, 242 (1971b)
76. Jarabak, J., Jr. Sack, G. H.: Biochemistry 8, 2203 (1969)
77. Pollow, K., Pollow, B.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 53 (1972)
78. Geisthövel, W., Breuer, H.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1206 (1971)
79. Arias, F., Warren, J. C.: Biochim. Biophys. Acta 230, 550 (1971)

80. Nunez, E., Engelmann, F., Benassayaz, C., Savu, L., Crepy, O., Jayle, M. F.: C. R. Acad. Sci. (Paris) 273, 242 (1971a)
81. Tseng, L., Gurpide, E.: Endocrinology 97, 825 (1975)
82. Jütting, G.: Arch. Endocr. (Kbh) Suppl. 145 (1970)
83. Gabb, R. G., Stone, G. M.: Aust. J. biol. Sci. 27, 137 (1974)
84. Wallenbach, B. C., Rakoff, A. W.: J. Einstein Med. Center 2, 3 (1953)
85. Kistner, R. W.: Clin. Obstet. Gynecol. 5, 1166 (1972)
86. Steiner, G. J., Kistner, R. W., Craig, J. M.: Metabolism 14, 356 (1965)
87. Kelly, R. M., Baker, W. H.: N. Engl. J. Med. 264, 216 (1961)
88. Kistner, R. W., Griffiths, C. T.: Clin. Obstet. Gynecol. 112, 447 (1968)
89. Hustin, J.: J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 77, 915 (1970)
90. Nordqvist, R. S. B.: Acta Obstet. Gynecol. Scand. 43, 296 (1964)
91. Heckman, I.: Obstet. Gynecol. Surv. 21, 847 (1966)
92. Anderson, D. G.: Amer. J. Obstet. Gynecol. 113, 195 (1972)
93. Kistner, R. W., Griffiths, C. T., Craig, J. M.: Cancer 18, 563 (1965)
94. Kistner, R. W.: Year Book Obstet. Gynecol. 552 (1965/66)
95. Reifenstein jr., E. C.: Cancer 27, 485 (1971)
96. Malkasian jr., G. D., Decker, D. G., Mussey, E.: Amer. J. Obstet. Gynec. 110, 15 (1971)
97. Rozier, J. C., Underwood, P. B.: Obstet. et Gynec. 44, 60 (1974)
98. Beato, M., Lederer, B., Boquoi, E., Sandritter, W.: Exptl. Cell Res. 52, 173 (1968)
99. Kreuzer, G., Boquoi, E.: Dtsch. Med. Wschr. 95, 1863 (1970)
100. Boquoi, E., Kreuzer, G.: Geburtsh. und Frauenheilk. 33, 697 (1973)
101. Boquoi, E., Ebner, H.: Arch. Gynäk. 215, 215 (1973)
102. Boquoi, E., Ebner, H.: Arch. Gynäk. 215, 285 (1973)

## Lebenslauf

Am 2. 4. 1949 wurde ich, Rolf Eberhard Jeske, als Sohn des Arztes Dr. med. Burkhard Jeske und seiner Ehefrau Hete, geb. Meyer, in Berlin geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Robert-Reinick- Schule in Berlin-Spandau und ab 1959 das Kant- Gymnasium in Berlin- Spandau, wo ich im Frühjahr 1968 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1968 nahm ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Humanmedizin auf, das ich im Februar 1974 mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.

Seit 1972 war ich mit Unterbrechungen mit der Anfertigung meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe Pollow im Isotopenlabor des Institutes für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin beschäftigt.

Von Mai 1974 bis November 1974 arbeitete ich als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses 3092 Hoya/Weser, Chefarzt Dr. med. Heising.

Im Dezember 1974 und im Januar 1975 war ich als Medizinalassistent an der Freien Universität Berlin, Institut für Molekularbiologie und Biochemie , Arbeitsgruppe Pollow, angestellt.

Von April 1975 bis September 1975 arbeitete ich, zunächst als Medizinalassistent, später als Assistenzarzt, an der chirurgischen Abteilung des St. Cornelius- Hospitals, 4060 Viersen 11, Chefarzt Dr. med. Wessels.

Seit dem 1. 10. 1975 bin ich an der Inneren Abteilung des Dr. Otto Geßler-Krankenhauses, 8998 Lindenberg/Allgäu, Chefarzt Dr. med. Gülden, beschäftigt.









Dissertationsdruck Fred Höpfner  
Pestalozzistr. 106 (Ecke Hebebrandstr.) 1 Berlin 12



312 88 85  
313 81 98